

## ⑫ 特 許 公 報 (B 2) 昭58-36736

⑤ Int.Cl.<sup>3</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公告 昭和58年(1983) 8月11日  
 G 01 N 27/46 A-7363-2G  
 27/30 E-7363-2G  
 // C 12 Q 1/02 8213-4B 発明の数 1

(全 4 頁)

1

2

## ⑭ 揮発性物質の測定法

⑮ 特 願 昭53-35907  
 ⑯ 出 願 昭53(1978) 3月28日  
 ⑰ 公 開 昭54-128393  
 ⑱ 昭54(1979)10月 4 日  
 ⑲ 発 明 者 久保 樹  
 横浜市緑区中山町 669 - 5  
 ⑲ 発 明 者 小花 春夫  
 川崎市幸区鹿島田 958  
 ⑲ 発 明 者 引馬 基彦  
 横浜市瀬谷区三ツ境 156 - 26  
 ⑲ 発 明 者 安田 武夫  
 横浜市港北区仲手原 1 - 19 - 31  
 ⑲ 発 明 者 軽部 征夫  
 立川市富士見町 4 - 11 - 18  
 ⑲ 発 明 者 鈴木 周一  
 東京都豊島区巣鴨 1 - 40 - 6  
 ⑲ 出 願 人 味の素株式会社  
 東京都中央区京橋 1 丁目 5 番 8 号

## ⑳ 特許請求の範囲

1 酸素電極の隔膜とこれを覆う揮発性物質透過性膜の間に、揮発性物質を酸化し酸素を消費する微生物を封入してなる微生物電極を被験液に接触せしめ、該電極電流の減少速度又は平衡電流を測定し、これら電流の減少速度又は平衡電流と揮発性物質の濃度との間の比例関係を利用して揮発性物質を測定することからなる揮発性物質の測定方法。

## 発明の詳細な説明

本発明は微生物電極を用いる揮発性物質の選択的測定法に関する。

発酵原料としてエタノール、メタノール、酢酸等の揮発性物質が用いられているが、これら発酵液中の揮発性物質の測定には従来ガスクロ法や半導体式検知法等が用いられて来た。しかしながら発酵液や排水等のように不揮発性物質が多量含ま

れている場合、ガスクロ法ではカラム中に不揮発性物質が蓄積し、長期間の測定が困難になる等の欠点があった。又装置が複雑化するため管理のオンライン化が容易でない。

5 一方半導体式検知法についても、その安定性に問題があり、オンライン管理用としては信頼性に欠けることが指摘されている。

そこで本発明者等は簡単で、安定性、信頼が高く、しかもオンライン管理に適した測定法について鋭意研究を重ねた結果、揮発性物質を酸化し酸素を消費する微生物を酸素電極の隔膜とこれを覆う揮発性物質透過性膜の間に封入又は固定化した微生物電極を用いることによりかかる目的に適した揮発性物質の選択的測定法を開発するに至った。

15 即ち本発明は上記微生物電極を揮発性物質を含む被験液に接触せしめ該微生物電極の電流の減少速度を測定し、該電流の減少速度と被験液中の揮発性物質濃度との間の比例関係を利用して被験液中の揮発性物質の濃度を選択的に測定するものである。

本発明の方法は極めて簡単であり、しかも2〜10分間という極めて短時間に、無試薬でしかも再現性良く安定に揮発性物質を選択的に測定することのできる新しい測定法である。以下本発明の方法について詳細に説明する。

本発明で使用する微生物は揮発性物質を酸化し同時に酸素を消費する能力を有する微生物で有れば良く、例えばトリコスポロン・ブラシカエ、サツカロミセス・セレビシエ等の酵母、プレバクテリウム・フラブムATCC14067、21475等の細菌あるいは種々の微生物の混合物である各種活性汚泥等が使用される。

揮発性物質透過性膜としてはシリコン膜が最も良く、ポリエチレン膜、ポリブタジエン膜、ポリプロピレン膜、ポリエステル膜、テフロン(登録商標名)膜等も使用できる。要は、溶存酸素と揮発性物質を選択的に透過するもので、ある程度

の透過性があり、溶存酸素の移動速度に比べ揮発性物質の移動速度の大きいものが望ましい。

酸素電極はガルバニツク型、ポーラロ型いずれでも良く市販のものを使用することができる。

本発明の微生物電極は次のようにして製作される。

まず、前記微生物を通常の栄養培地で通常の方法で培養し、培養液から微生物菌体を分離し、ペースト状の菌体懸濁液とする。電素電極の隔膜上に菌体を塗布し、要すればこれを支持するため、ナイオン網等で支持しこの上を前記揮発性物質透過性膜で覆い、輪ゴム等でしっかりと電極に取りつけば第1図に示すような微生物電極が得られる。

第1図はガルバニツクタイプの酸素電極を用いた微生物電極であり、第1図中1は微生物層、2は支持層、3は揮発性物質透過性膜、4は酸素電極の隔膜、5は白金カソード、6はアルミニウムアノード、7は塩化カリウム液、8, 8'は輪ゴムを示す。

第1図中の1の微生物層の代りに固定化微生物膜を用いても良く、微生物をコラーゲン、ポリアクリルアミドゲル等で通常の酵素の包括固定化法に順じて固定化して固定化微生物膜を作り、これを適当な大きさに切つて封入すれば良い。ただし効果は固定化微生物膜を用いても全く変わらないので特に固定化微生物膜を使う必要はない。

本発明の方法の原理は次のように説明される。上記微生物電極を不揮発性物質を含有する被験液に接触せしめる。シリコン膜等の揮発性物質透過性膜は沸点の低いエタノール、メタノール、酢酸、低級ケトン類等を透過するが、糖類、アミノ酸、有機酸塩、無機塩類等は透過せず、その透過速度はその物質の蒸気圧に比例する。従つて菌体層へは酸素及び揮発性物質のみが到達し得る。微生物は揮発性物質を消費(資化)し、同時に酸素を消費するからそれに比例して隔膜近傍の溶存酸素濃度が減少しその結果、該微生物電極の電流が減少する。

微生物電極の電流の減少速度とその微生物によつて消費・資化される有機物の濃度との間には比例関係が成立することが知られているが、本発明の微生物電極の電流の減少速度も被験液中の揮発性物質濃度に良く比例する。従つて、この電流の

減少速度を測定することにより、揮発性物質の濃度を知ることができる。

第2図は本発明の方法を連続的に実施する場合の実施態様の1つを示すものである。第2図中1は微生物電極、2はゴムパツキング、3はフローセル(内容2~10ml)、4はマグネチツクスターラー、5は攪拌子、6はレコーダー、7は空気注入口、8は水(キャリアー液)注入口、9はサンプル注入口を示す。

第2図のシステムにそつて本発明の方法を説明すると、まず、キャリアー液として酸素で飽和した水をポンプで測定セル(フローセル:6)内を通して置く、サンプルをサンプラーで0.5~2.0分間一定間隔(10~20分間)で注入口12から注入するとサンプルはキャリアー液で適度に希釈され(0.01~1%)フローセル内に入り微生物電極1と接触する、フローセル中のサンプルの揮発性物質と溶存酸素のみが揮発性物質透過膜を透過し、微生物層に達し、微生物により資化され酸素が消費される。従つて酸素濃度が減少し微生物電極電流が減少し、レコーダー9に減少した電流のピークが記録される(第4図参照)。測定する物質の濃度とピークの高さの関係を求めておけば、このピークの高さから濃度を簡単に知ることができる。

一方、本発明の方法をバツチ式で測定する場合には、微生物電極をサンプル液に接触し、一定時間(0.5~5分間)に於る電流の減少量を求めるか又は平衡電流値を測定すれば良い。測定中被験液中の溶存酸素濃度を一定に保つて測定する場合、測定時間が長くなると電流値は一定になり平衡状態に達する。この平衡時の電流値又は電流の減少値も又被験液中の揮発性物質濃度に比例するので、平衡電流の減少量から求めることもできる。

測定の方法は用いる微生物の活動に適した条件下で行うことが望ましく、通常PH4~8.0、温度15~45℃の条件で行えば良い。

微生物電極とサンプルとの接触時間は微生物の反応が早いので0.5~10分間で十分である。このようにサンプルとの接触時間が短いことは単に測定時間が短縮できることのみならず使用する微生物電極の汚染も少なくてすみ、長期間の使用が可能となる。

本発明の方法によつて酢酸を測定する場合には、

測定時のpHを酸性(pH4以下)にして測定することにより容易に測定することができる。又使用する微生物の種類によつてエタノール、メタノールを分離して測定することもできるし、さらにはメタン、水素等のガス成分の分析も可能である。

上述の如く本発明は、揮発性物質が多量に含まれている発酵液又は排水に含まれている揮発性物質を選択的に測定する優れた測定方法を提供するものである。

#### 実施例 1

ポテト・デキストロース寒天フラント培地(pH 6.0)上に25℃で3日間スラント培養したトリコスポロン・ブラシカエ(*Trichosporon brassicae*) CBS 6382の微生物菌体を一白金耳を径10mmのミリポアフィルターに塗布し、これをガルバニツクタイプの酸素電極の隔膜上に貼りその上をシリコン膜(DCO<sub>2</sub>センサー用、silicone Film, Radiometer, Copenhagen)で覆い、輪ゴムで電極に固定し第1図に示すような微生物電極を作製した。この微生物電極を用いて第2図に示す連続測定システムを組立て以下の実験を行つた。

まず系内にキャリアー液として溶存酸素飽和の水を通し(流量3.0ml/min)電極電流をレコーダーに記録する(ベースライン)、ベースラインが安定した後サンプル注入口から一定濃度のエタノール溶液を30分間隔で順次注入した(パルス巾1.5分間)。第3図のたて軸は得られた電極電流の減少のピークの高さを示し、横軸はフローセル内に於るエタノールの濃度を示すものであるが、第3図に於てエタノール濃度とピークの高さは良く比例している。

全く同様にしてエタノール、グルコースとエタノール、及びグルコース水溶液を順次注入してグルコースの影響を調べたがグルコースの影響は全

く見られなかつた。

#### 実施例 2

サツカロミセス・セレビスエ-CBS1172を次に示す培地を用いて30℃で35時間フラスコ振盪培養を行つた。培養液を遠心分離して除菌し得られる上清液にエタノールを添加しエタノール

#### 培地組成(pH 6.0)

成 分	含 量
ケーンモラセス	3.0%(糖換算)
10 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1%
コーンステイープリカー	0.1%
硫 安	0.5%
硫酸マグネシウム	0.05%

ル濃度が0.1~1.0%のサンプルを作つた。これを実施例1と全く同様の方法で測定し、ガスクロ法で測定したフローセル中のアルコール濃度に対して電極電流のピークの高さをプロットした。これは第3図に白丸で示した。第3図はこの測定法が不純物によつて全く影響を受けないことを示している。

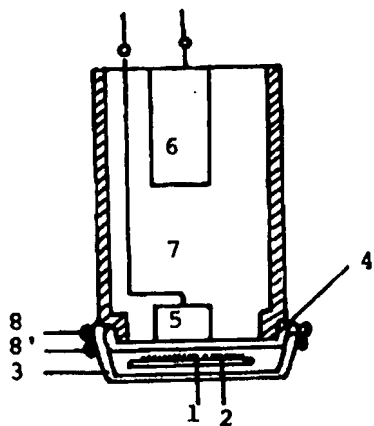
#### 実施例 3

1.6%のグルコース水溶液に酢酸ソーダを0.4%~2.0%添加し、そのpHをリン酸で4.0に調節した。これを実施例1と全く同様にしてパルス巾10分間でフローセル内に注入し電圧出力を測定した。フローセル中のサンプルの酢酸の濃度と電極電流のピークとの間には第4図に示す直線関係が見られた。

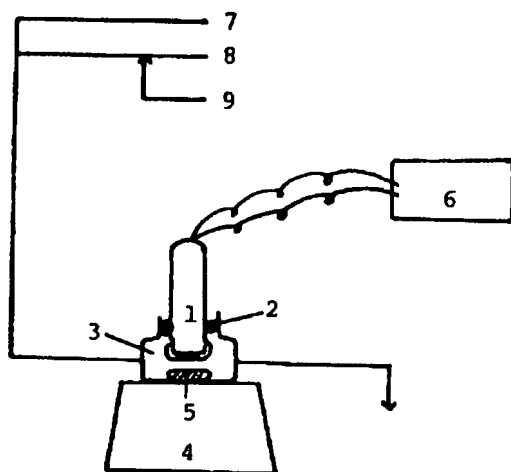
#### 図面の簡単な説明

30 第1図は本発明の微生物電極の概略図、第2図は微生物電極を用いる揮発性物質測定システムの略図、第3図は純系に於るエタノールの濃度と電極電流の関係を示すグラフ、第4図は酢酸の濃度と電極電流との関係を示すグラフである。

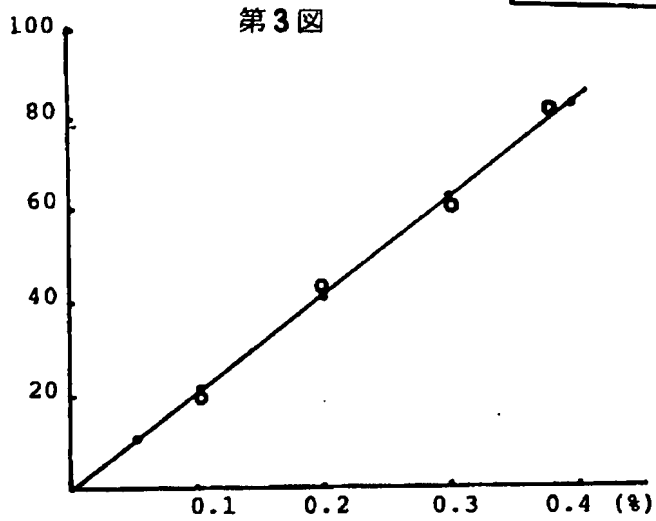
第1図



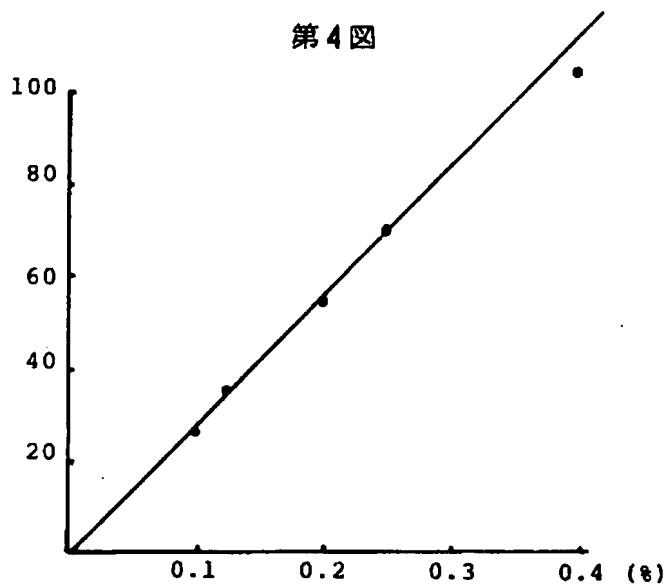
第2図



第3図



第4図



Translation of Japanese Reference

METHOD FOR MEASURING A VOLATILE MATERIAL

5     Claims

1. A method for measuring a volatile material, comprising the steps of:  
    contacting a microorganism electrode with a test solution,  
    measuring the rate of decrease in the electric current or the balanced electric current on  
the electrode, and  
10     measuring the volatile material by using the proportional relationship between the  
decrease rate of the electric current or the balanced electric current and the concentration of  
volatile material,  
    wherein the microorganism electrode comprises a microorganism that catabolizes a  
volatile material and consumes oxygen, and the microorganism is enclosed in between the  
15     separating membrane of an oxygen electrode and a membrane that permeates the volatile  
material and covers the separating membrane.

Detailed Description of the Invention

20     The present invention relates to methods for selectively measuring volatile materials  
using a microorganism electrode.

Volatile materials such as ethanol, methanol, acetic acid, and the like have been used as  
raw materials for fermentation. Conventionally, the measurement of such volatile materials in  
fermented liquid has been performed by gas chromatography, semiconductor-type detection  
method, and the like. However, when solutions contains a large amount of non-volatile  
25     materials as in the case of fermented liquid, wastewater and such, non-volatile materials  
accumulate in the column for gas chromatography, making it difficult to perform the  
measurement for long period. In addition, since the equipments tend to be complex, online  
administration is not easy.

30     On the other hand, the semiconductor-type detection has a problem in the stability, and  
the lack of reliability in use for online administration has been also pointed out.

Thus, the present inventors carried out dedicated studies on a measurement method that  
is simple, highly stabile and reliable, and suitable for online administration. As a result, they  
developed a method for measuring volatile materials selectively, suitable for the above objectives,  
using a microorganism electrode in which a microorganism that catabolizes volatile materials  
35     and consumes oxygen is enclosed or immobilized in between the separating membrane of the  
oxygen electrode and a membrane that permeates volatile materials and covers the separating

membrane.

Thus, the present invention provides a method for measuring volatile materials by contacting the above microorganism electrode with a test solution containing volatile materials, measuring the rate of decrease in the electric current on the electrode, and determining the concentration of the volatile materials in the test solution selectively using a proportional relationship between the decrease rate of the electric current and the concentration of the volatile material in the test solution.

The method of the present invention is an extremely simple and novel method that can selectively measuring volatile materials in very short time of 2-10 min with excellent reproducibility and stability using no reagent. The method of the present invention will be described in detail below.

Microorganisms used in the present invention may be those able to catabolize a volatile material and consume oxygen; for example, yeast such as *Trichosporon brassicae* and *Saccharomyces cerevisiae*, bacteria such as *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 and 21475, and a variety of activated sludge, which is a mixture of various microorganisms.

The membrane that permeates a volatile material is most preferably a silicon membrane, but membranes of polyethylene, polybutadiene, polypropylene, polyester, Teflon (registered trade mark), and the like may also be used. Specifically, it is preferable to use membranes that are capable of selectively permeating dissolved oxygen and the volatile material and that have a certain degree of permeability, in which the mobility of the volatile material is greater than that of dissolved oxygen.

The oxygen electrode can be either the galvanic type or polarographic type, and may be those commercially available.

The microorganism electrode of the present invention may be made as follows.

First, the above microorganism is cultured in the standard nutrition medium using the standard method, isolated from the culture fluid to obtain a microorganism suspension in paste form. The microorganism is spread on the separating membrane of the oxygen electrode, and, if necessary, supported with nylon mesh or the like, covered with the above membrane that permeates volatile materials, and attached to the electrode tightly using rubber bands or the like to obtain a microorganism electrode as shown in Fig. 1.

Fig. 1 illustrates a microorganism electrode using the galvanic-type oxygen electrode. Therein, the numbers represent follows: 1. microorganism layer; 2. supporting layer; 3. volatile material permeating membrane; 4. separating membrane of the oxygen electrode; 5. platinum cathode; 6. aluminum anode; 7. potassium chloride solution; and 8 and 8'. rubber band.

In Fig. 1, in place of the microorganism layer 1, a microorganism-immobilized membrane may be used. The microorganism-immobilized membrane may be prepared by

immobilizing a microorganism with collagen, polyacrylamide gel, or the like according to the standard methods for immobilizing and enclosing enzymes. The membrane may be cut into appropriate size, and enclosed. However, since the effect obtained by using the microorganism-immobilized membrane is the same, there is no need to use the  
 5 microorganism-immobilized membrane.

The principle of the method of the present invention is explained below.

The above microorganism electrode is contacted with sample solution containing non-volatile materials. The volatile material-permeating membranes such as silicone membrane, permeate materials with low boiling temperature such as ethanol, methanol, acetic  
 10 acid, lower ketones, and the like, but does not permeate sugars, amino acids, organic acid salts, inorganic salts, or the like. The rate of permeation is proportional to the vapor pressure of each material. Thus, only oxygen and volatile materials can reach the microorganism layer. Since the microorganism catabolizes volatile materials and consumes oxygen concomitantly, the concentration of dissolved oxygen near the separating membrane of the oxygen electrode  
 15 decreases proportionally, resulting in the decrease of the electric current of the microorganism electrode.

It is known that there is a proportional relationship between the rate of decrease in the electric current on a microorganism electrode and the concentration of organic materials consumed and catabolized by the microorganism. Similarly, the rate of decrease in the electric  
 20 current on the microorganism electrode of the present invention is well proportional to the concentration of volatile materials in sample solution. Thus, by measuring the rate of decrease in the electric current, the concentration of volatile materials can be determined.

Fig. 2 illustrates an embodiment of the method of the present invention where the measurement is carried out continuously. Therein, the numbers represent follows: 1.  
 25 microorganism electrode; 2. rubber packing; 3. flow cell (volume 2-10 ml); 4. magnetic stirrer; 5. stirring bar; 6. recorder; 7. air inlet; 8. water (carrier solution) inlet; and 9. sample inlet.

The method of the present invention will be explained in accordance with the system shown in Fig. 2. First, as a carrier solution, oxygen-saturated water is flowed through the measuring cell (flow cell 6) with a pump. A sample is injected through the inlet 12 using a  
 30 sampler with constant intervals of 0.5-2 min for 10-20 min. The sample is diluted with the carrier solution to an appropriate concentration (0.01-1%), entering inside the flow cell to contact with the microorganism electrode 1. Only the volatile materials and dissolved oxygen in the sample in the flow cell can permeate through the volatile material-permeating membrane, reaching the microorganism layer, and are catabolized by the microorganism, which  
 35 concomitantly consumes oxygen. As the oxygen concentration decreases, the electric current on the microorganism electrode decreases, and a peak of the decreased electric current is

recorded by the recorder 9 (see Fig. 4). By predetermining the relationship between the concentration of materials to be measured and the peak level, the concentration can be determined based on the peak level.

Alternatively, when the method of the present invention is employed in batch mode, the microorganism electrode may be contacted with sample solution, and the decrease in the electric current during a certain period of time (0.5-5 min) or the balanced electric current may be measured. When the concentration of dissolved oxygen in sample solution is maintained at a constant level during measurement, the electric current will become constant and reach equilibrium as the measurement time becomes longer. This balanced electric current or decrease in the electric current is also proportional to the concentration of volatile materials, and thus the concentration can be determined from the decrease in the balanced electric current.

The measurement is preferably carried out under conditions suitable for the activity of the used microorganism, and normally carried out at 15-45°C with pH 4.0-8.0.

Because the reaction of the microorganism is fast, sufficient duration for the contact between the microorganism electrode and sample may be 0.5-10 min. This short time for the contact not only shorten the time required for measurement but also enables less contamination of the microorganism electrode, thus enabling its use for long time.

When measuring acetic acid by the method of the present invention, an acidic pH (pH 4.0 or lower) may be used to facilitate simple measurement. Moreover, some microorganisms can be used to distinctively measure ethanol or methanol, and furthermore, gaseous components such as methane and hydrogen can be analyzed.

As described above, the present invention provides an excellent method for selectively determining the concentration of volatile materials in fermented liquid or wastewater, which contains a large amount of non-volatile materials.

#### [Example 1]

One loopful of microbial cells of *Trichosporon brassicae* CBS6382, which has been slant-cultured on Potato Dextrose Agar medium (pH 6.0) at 25°C for 3 days, was spread on a Millipore filter with 10 mm diameter. The filter was attached on the separating membrane of the galvanic type oxygen electrode, covered with silicone membrane (silicone film for DCO<sub>2</sub> sensors, Radiometer, Copenhagen), and fixed on the electrode using rubber bands to make a microorganism electrode as shown in Fig. 1. Using this microorganism electrode, a system for continuous measurement as shown in Fig. 2 was made, and the following experiments were performed.

First, as a carrier solution, dissolved oxygen-saturated water was flowed through the system (flow rate at 3.0 ml/min), and the electric current was recorded by the recorder (base line).



After the base line became stable, ethanol solution of a defined concentration was injected through the sample inlet continually with 30 min intervals (pulse width, 1.5 min). In Fig. 3, the vertical axis shows the peak level of the decreased electric current, and the horizontal axis shows the concentration of ethanol in the flow cell. As shown in Fig. 3, the ethanol concentration was well proportional to the peak level.

The effect of glucose was examined by injecting ethanol, glucose and ethanol, and glucose solution sequentially in the same way as described above. However, the effect of glucose was not observed.

#### 10 [Example 2]

*Saccharomyces cerevisiae* CBS1172 was cultured in a flask with shaking at 30°C for 35 hr using the medium shown below.

<u>Medium composition (pH 6.0)</u>	
Ingredients	Content
Cane molasses	3.0% (in sugar equivalent)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1%
Corn steep liquor	0.1%
Ammonium sulfate	0.5%
Magnesium sulfate	0.05%

15

The culture medium was centrifuged to remove the fungi. To the resultant supernatant, ethanol was added to make samples with ethanol concentrations of 0.1-1.0%. These samples were applied to the measurement as described in Example 1, and the peak levels of the electric current were plotted against the alcohol concentrations in the flow cell which were determined by gas chromatography. Data were indicated by open circles in Fig. 3. The results in Fig. 3 indicated that the method of the present invention was totally unaffected by the presence of impurities.

20

#### [Example 3]

25 Sodium acetate was added at the final concentration of 0.4-2.0% to an aqueous glucose solution (1.6%), and the pH of the resulting solution was adjusted to 4.0 using phosphoric acid. This solution was injected into the flow cell as described in Example 1 with the pulse width 10 min, and the output electric voltage was measured. As shown in Fig. 4, there was a linear relation between the acetate concentration of samples in the flow cell and the peak electric

current on the electrode.

### Brief Description of the Drawings

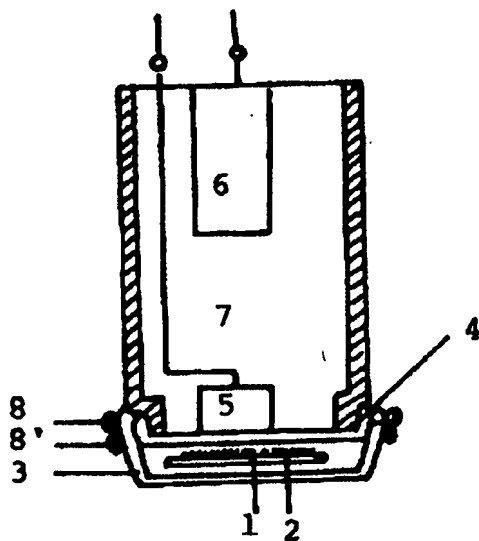
Fig. 1 shows a schematic diagram of the microorganism electrode of the present invention.

Fig. 2 shows a schematic diagram of the system for measuring volatile materials using the microorganism electrode.

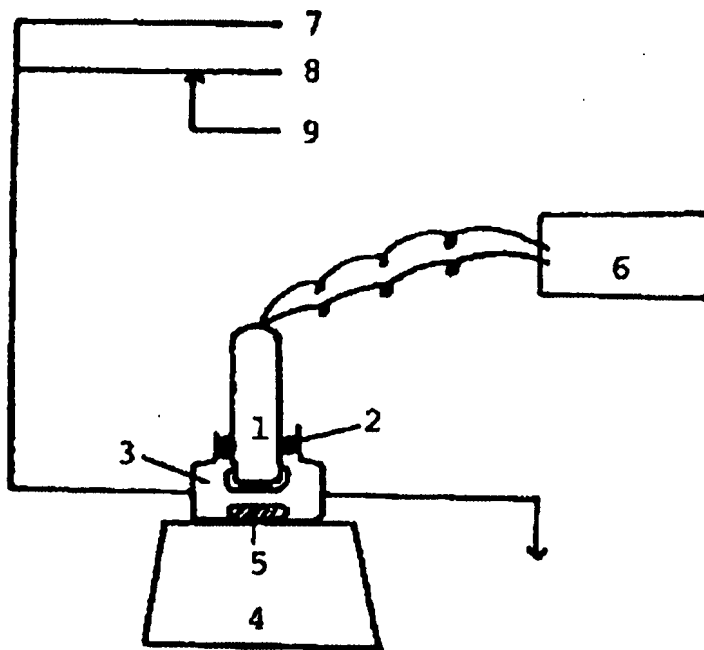
Fig. 3 is a graph showing the relationship between the ethanol concentration and the electric current on the electrode in the pure system.

Fig. 4 is a graph showing the relationship between the acetate concentration and the electric current on the electrode.

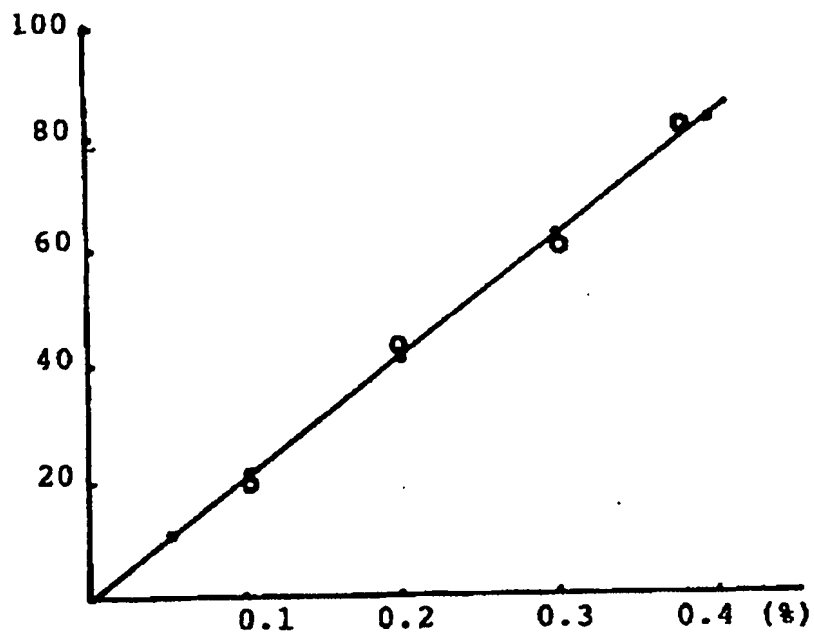
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

